

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002018

International filing date: 11 August 2004 (11.08.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0055326
Filing date: 11 August 2003 (11.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 13 September 2004 (13.09.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)

Best Available Copy

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0055326 호
Application Number 10-2003-0055326

출 원 년 월 일 : 2003년 08월 11일
Date of Application AUG 11, 2003

출 원 인 : (주)아비코아생명공학연구소 외 1명
Applicant(s) AVICORE BIO TECHNOLOGY INSTITUTE INC., et al

2004 년 9 월 13 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】	
著者명	특허출원서
著者구분	특허
著者처	특허청장
출원일자	2003.08.11
발명의 명칭	정원세포를 이용한 조류 카메라의 생산방법 및 조류 카메라
발명의 영문명칭	Method for Producing Avian Chimera Using Spermatogonial Cells and Avian Chimera
출원인	
【명칭】	(주)아비코아생명공학연구소
【출원인코드】	1-2001-034930-9
출원인	
【명칭】	재단법인 서울대학교 산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
대리인	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순,김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지청변리사】	최홍순 ,김경철 ,양부현
【포괄위임등록번호】	2001-056972-5
발명자	
【성명의 국문표기】	한재용
【성명의 영문표기】	HAN,Jae Yong
【주민등록번호】	610409-1405718
【우편번호】	135-969
【주소】	서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 17동 308호
【국적】	KR
발명자	
【성명의 국문표기】	임정묵
【성명의 영문표기】	LIM,Jeong Mook
【주민등록번호】	630405-1052411
【우편번호】	137-044

【주소】
~

서울특별시 서초구 반포4동 60-4 미도아파트 308동 404호

【국적】

KR

!!명자】

【성명의 국문표기】

이영목

【성명의 영문표기】

LEE.Young Mok

【주민등록번호】

770909-1120017

【우편번호】

441-440

【주소】

경기도 수원시 권선구 탑동 33단목 9롯데 오성맨션 101호

【국적】

KR

!!명자】

【성명의 국문표기】

김진남

【성명의 영문표기】

KIM.Jin Nam

【주민등록번호】

721022-1231526

【우편번호】

429-832

【주소】

경기도 시흥시 철곶2동 487-4번지

【국적】

KR

!!명자】

【성명의 국문표기】

홍영호

【성명의 영문표기】

HONG.Yeong Ho

【주민등록번호】

660816-1479032

【우편번호】

442-821

【주소】

경기도 수원시 팔단구 원천동 35 원천주공아파트 105동 910호

【국적】

KR

!!명자】

【성명의 국문표기】

한범구

【성명의 영문표기】

HAN,Beom Ku

【주민등록번호】

690115-1066628

【우편번호】

152-763

【주소】

서울특별시 구로구 구로동 1259번지 43-2 구일우성아파트 203동 801호

【국적】

KR

▶사청구	청구	
▶지	독허법 제42조의 규정에 의한 출원. 독허법 제60조의 규정에 의한 출원심사금 청구합니다. 대리인 독허법인 세션(대표변리사 최홍순.김경천) (인)	
▶수수료		
【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	14 면	14,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	15 항	589,000 원
【합계】	632,000 원	
【감면사유】	전담조직	
【감면후 수수료】	316,000 원	
▶부서류	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.소기업임금 증명하는 서류_1통 3.전담조직임금 증명하는 서류_1통 4.위임장_1통	

【요약서】

요약】

본 발명은 (a) 공여체 조류의 정소란 수득하는 단계: (b) 상기 정소로부터 정소 포 파플레이션 (population)을 분리하는 단계: (c) 상기 정소 세포 파플레이션 (population)을 세포성장인자가 포함된 배지에서 배양하여 정원 세포 파플레이션을 수득하는 단계: 및 (d) 상기 배양한 정원 세포 파플레이션 또는 상기 정소 세포 파플레이션을 수용체 조류 정소에 주입하여 카이메라를 생산하는 단계란 포함하는 정원세포란 이용한 조류 카이메라의 생산방법 및 생식선 조류 카이메라에 관한 것이다.

【표도】
도 3

【인어】

카이메라, 생식선 카이메라, 정원세포, 조류, 닭, 배양, 정소세포

【명세서】

발명의 명칭】

경원세포간 이용한 조류 카이메라의 생산방법 및 조류 카이메라 {Method for
ducing Avian Chimera Using Spermatogonial Cells and Avian Chimera}

2면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 경원세포를 이용한 조류 카이메라 생산 과
을 나타내는 모식도이다.

도 2는 닭의 정소내에 경원세포의 주입이 가능함을 보여주는 사진으로서, 정소
세정관내가 트립판 혼탁로 염색이 되어 있다.

도 3은 본 발명의 방법에 의해 생산된 생식선 카이메라의 자손을 보여주는 사진
다.

도 4는 4주령 한국 오피계의 경원세포의 체외 배양 일령에 따른 형태를 보여주
사진이다. 사진내에 있는 숫자는 일령을 나타낸다.

도 5는 24주령 한국 오피계의 경원세포의 체외 배양 일령에 따른 형태를 보여주
사진이다. 사진내에 있는 숫자는 일령을 나타낸다.

발명의 상세한 설명]

..

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 정원세포를 이용한 조류 카이메라의 생산방법, 생식선 전이 조류 카메라 및 형질전환 조류의 생산방법에 관한 것이다.

1994년 미세주입 방법 (microinjection)에 의하여 성공적으로 생쥐 정원세포 (permatogonial cell)의 이식 (Brinster and Zimmerman, 1994; Brinster and arbock, 1994)이 이루어진 이후로, 이와 관련된 수많은 보고서와 논문이 발표되었다. 초기단계에서 이 연구는 정원세포의 수용체 정소세관내로의 이식기술 (ransplantation technology)의 개발에 초점이 맞추어졌다 (Ogawa 등, 1997; Nagano d Brinster, 1998; Nagano 등, 1998; Russell and Brinster, 1998; Russell 등, 98) .

1994년 Brinster 그룹에서 발표된 정원세포에 관한 연구에서, 공여체로부터 분된 정원세포가 성공적으로 이식되어 정자를 생산하는 것을 보여주었으며, Brinster Zimmerman은 유전적으로 한입인 수컷 마우스의 세정관 (seminiferous tube)내로 소세포 부유액 (heterogeneous mouse testis cell mixture)의 주입에 의한 생식선 이메라 (germline chimera)의 생산을 보고하였고, 표지 유전자로서 lac Z를 포함하 정소세포가 세정관내의 관강 (lumen)의 가장 아래쪽인 기저층 (basal membrane)까 이등이 가능한 것을 확인하였다.

•

정원세포의 이식을 위한 미세주입 방법은 획기적인 것은 아니었으나, 이후 기술 발달에 의하여 정소망 (rete testis)과 정소세관의 연결 부위 (connection)간 이용하여 수용체 (recipient)의 정소세관 내부에 공여세포 (dornor cell)로 가득채우는 것은 가능하였다. 이에 Brinster와 Avarbock는 1994년 정소세포 이식 (testicular ll transplantation)을 통해 lacZ 유전자간 가진 정자간 수용체 정소 내에서 성공으로 생산할 수 있음을 보인 동시에, 화학물질을 이용한 수용체 정소의 불임화 (sterilization)에 관한 연구간 진행하여, 부설판 (Busulfan)이 내생의 (endogenous) 원세포는 죽이지 않으면서 동시에 수용체의 정자형성 (spermatogenesis)을 막을 수 있다는 것을 보여주어 수용체의 불임화간 통한 이식 효율 증진의 가능성을 보여 주다.

그 이후 정원세포 이식에 관한 보고는 Jiang 과 Short에 의해 1995년 발표되었데, 여기에서는 원시생식세포 (Primordial Germ Cell)와 발생 후의 정소세포의 이후 수용체 쥐의 정소 내에서의 군집 (colonization) 형태간 조사한 결과, 원시생 세포의 경우 정소세관 내에서 완전한 형태는 아니지만 정소세관과 유사한 형태를 성하는 것을 관찰하였고, 출생 이후의 정소 (testis)로부터 분리된 생식세포의 경우 수용체의 정소 조직과 결합하여 정자형성과정이 진행되는 것을 관찰하였다.

그 이후에 이종간의 정원세포의 이식에 관한 연구가 보고되었는데 (Clouthier , 1996), 이 연구에서 면역결핍 생쥐 (SCID mouse) 내로 이식된 쥐 (rat)의 정원세포에 의한 정자형성이 이루어졌고 그 결과로 생쥐의 정자에서는 볼 수 없는 형태의, 쥐 (rat) 정자의 두부의 형태를 가진 정자를 생쥐 (mouse) 정소 내에서 확인 할 있었다. 이전까지의 연구와 통념으로는 세르틀리 세포 (sertoli cell)는 정자형

에 매우 깊이 연관되어 있으며 이것은 결코 이종, 즉 외부로부터 이식된 다른 생식
포단 지지 (supporting) 할 수 없다는 것이었으나, 이와 같은 이종간의 이식이 성
함으로써 세르틀리 세포의 역할에 대하여 기존의 인식이 전환되는 계기가 되었다.
세르틀리 세포로부터 분비되는 정자형성에 필요한 물질들은 융통성 있게 생식세포
작용할 수 있다는 새로운 이론이 생겨나게 되었다.

그러나 생쥐의 경우 서로 다른 종간의 이식이 성공적이었지만 다른 종의 경우
역 결핍 (immunodeficient) 생쥐의 사용에도 불구하고 생식세포의 성숙
aturation)에 의한 정자생산에는 실패하였다 (Ogawa 등, 1996b; Dobrinski 등,
99b). 이는 면역거부반응 (allogenic response)에 의한 정자 형성 실패보다는 쥐
생쥐에서의 결과란 생각해볼 때 유전적으로 또는 진화적으로 유사한 종의 경우에
종간의 이식이 한정되는 것으로 유추할 수가 있었다. 최근 연구 또한 이러한 문
단 풀기 위해 초점을 생식세포의 발생 시점 (germ cell developmental timing)에
주고 있다 (Franca 등, 1998). 즉 생쥐 정자의 성숙이 이루어지기 위하여서는 최
35일이 소모되고, 쥐의 경우에는 52-53일이 소모된다. 따라서 이러한 경우에는
의 정소 내로 생쥐의 정원세포의 이식을 하는 것이 더 좋은 효과를 가져올 가능성
있다는 것이다.

실제 현미경과 전자 현미경 연구가 진행되면서 이종간 또는 등종간 이식된 생식
포의 형태에 관한 연구가 진행되었는데 (Russell and Brinster, 1996), 이 연구가
행되면서 생쥐의 정소 내로 이식된 쥐의 생식세포는 기형의 형태를 띠는 경우가 있
것을 관찰하였으며, 이는 쥐의 정자형성이 생쥐의 세르틀리 세포와 연관되었던 이
로 생각되고 있다.

이밖에 현재까지 이종간 이식에 관한 연구는 생쥐, 소, 원숭이, 사람 정소세포 식 (Schlett 등, 1999), 사람 정소 세포의 생쥐 정소내 이식 (Zhang 등, 2003), 토 와 개 정소세포의 마우스 정소내 이식 (Dobrinski 등, 1999), 햄스터 정소 세포의 우스 정소내 이식 (Ogawa 등, 1999), 대가축 (소, 돼지, 말) 정소세포의 마우스 정 내 이식 등에 관한 보고가 있다.

정원세포를 새로운 형질전환 기술로 응용하기 위해서는 정원세포의 저장과 체외 양이 필수적요소라 할 수 있다. 그 첫 번째 보고로서 체외에서 3개월 배양된 정 세포의 성공적인 이식이 보고되었다 (Brinster and Nagano, 1996). 이후 체외에 이식 전까지 냉동저장 된 정원세포 또는 정소세포 부유액을 이용한 성공적인 이식 보고되었다 (Avarbock 등, 1996).

수용체 정소 내에서 이식된 공여 세포의 군집 (colony)의 관찰 또한 이루어졌다 Nagano 등, 1999; Parreira 등, 1998). 이 보고에 따르면 이식된 정원세포들이 소세관의 맨 아래 쪽 기저 면에서 관찰되는 것을 확인하였고, 파라핀 절편 관찰 (araffin section)을 통한 실험을 통해 이식 3개월 후에 공여세포로부터 유래한 정 가 평균 30%정도 분포하는 것을 관찰하였다.

효과적인 이식을 위하여 최적능도의 이식할 세포 수의 결정 또한 필요하였는데 초로 영상 분석 (image analysis) 기술을 이용하여 얻은 최적조건은 10^7 공여세포 /정소이며 (Dobrinski 등, 1996b), 이때 낮은 남성호르몬 (testosterone) 농도에서 과가 높은 것으로 보고된다 (Ogawa 등, 1998). 이전의 보고에서는 알 수 없었지 , 이후 연구에서 항체를 이용한 정원세포의 순수분리에 의한 이식 보고에 의하면 때까지 증가된 순도의 정소세포를 얻을 수 있었고, 이것의 이식은 수용체 내에서

들어지는 공여세포 유래 군집의 숫자에 정비례한다는 것 (Shinohara 등, 1999)을
수 있었다.

정원세포 이식에 관한 연구는 최근 사람에 대해서도 많이 진행되고 있다
chiatt 등, 1999). 인간에서는 어릴 때 보관된 정원세포에 의해 성인이 된 후 예
치 못한 일에 의한 참임이나 또 다른 경우에 이식하여 이용할 수 있는 가능성이 있
며, 정원세포로부터 유래되는 정자에 의해 체외 배양 및 체외 수정에 의한 인공수
에도 응용할 수 있는 잠재성을 지닌다.

조류에서는 원시생식세포 또는 배아 생식세포주 (embryonic germ cell)를 이용
생식선 카이메라 생산, 이를 통한 형질전환 닭 생산 시스템에 관한 보고가 있었으
형질전환 닭 생산 효율이 아직은 낮은 상태이다 (Cheng 등, 1996). 최근 닭의
정란 내로 정자란 이용하여 유전자란 도입하기 위한 방법이 소개되었는데 (Qian 등
2001), 이러한 방법 역시 아직은 그 효율이 매우 낮은 상태이며 개체 내로의 안정
인 유전자 전이가 어렵고, 생식선 전이 (germline transmission)가 확인되지 않아
질전환 시스템을 확립하기에는 많은 문제점이 남아 있는 상태이다.

이러한 정원세포의 경우 성숙으로부터 세포를 다량으로 얻기가 쉬우며, 정소 내
이식될 경우 생식선 기이페라의 생산능력이 있어서 이전의 배아줄기 세포를 이용
때의 문제점인 시간적, 효율적인 문제점 해결할 수 있다. 또한 유전자가 도입된
정원세포의 이식에 의한 수용체 정소 내에서의 정자형성의 보고 (Nagano 등, 2000)
정원세포를 이용한 형질전환 동물의 생산 시스템으로의 개발 가능성을 보여준다.

한편, 현재까지 정원세포를 이용한 조류 카이메라 생산에 대한 보고는 없다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속한 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명자들은 상술한 당업계의 오랜 요구를 해결하고자 예의 연구 노력한 결과, 조류의 경원세포를 이용하여 카메라 생산이 성공적으로 이루어짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 경원세포를 이용한 조류 카메라의 생산방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 생식선 전이 조류 카메라를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 형질전환 조류의 생산방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면의 해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 공여체 조류의 경소를 수득하는 단계: (b) 상기 경소로부터 경소 세포 파플레이션 (population)을 분리하는 단계: (c) 기 경소 세포 파플레이션 (population)을 세포성장인자가 포함된 배지에서 배양하

정원 세포 파플레이션을 수득하는 단계: 및 (d) 상기 배양한 정원 세포 파플레이 또는 상기 정소 세포 파플레이션을 수용체 조류 정소에 주입하여 카이메라간 생산 단계간 포함하는 정원세포간 이용한 조류 카이메라의 생산방법을 제공한다.

본 발명은 조류에 있어서, 정원세포간 이용한 조류 카이메라 생산 시스템을 확 한 최초의 발명이다. 본 발명의 방법을 각각의 단계에 따라 상세하게 설명하면 음과 같다:

우선, 공여체 (donor)로부터 정소간 수득한다. 만일, 본 발명이 닭에 적용되 경우, 정원세포원으로서의 닭은 바람직하게는 발생직후-70주령, 보다 바람직하게 발생직후-50주령, 가장 바람직하게는 4-30주령의 수컷을 이용한다. 닭의 정소는 수공을 분리한 후 전개하여 얻을 수 있다.

이어, 상기 정소로부터 정소 세포 파플레이션을 분리한다. 상기 과정에 의해 리한 정소의 주위에 있는 결체조직 및 막 등을 제거하고 정소조직을 둘러싸고 있는 막을 제거한다. 그런 다음, 정소를 해부용 칼을 이용하여 잘게 절단하고, 여러 지 분해방법을 통하여 분해한 다음, 정소 세포간 분리한다.

본 명세서에서, 용어 "정소 세포 (testicular cell)"은 정원줄기세포, 정원줄기 포에서 유래된 모든 생식세포를 포함한 정원 세포, 세르틀리 세포 (Sertoli cell), 질세포 (Leydig cell) 그리고 기타 결체조직에 관련된 근육세포 등을 포함하는 정 조직 내의 세포군을 의미하며, 용어 "정소 세포 파플레이션"과 혼용된다.

경소 조직의 분해는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있으며, 일반적으로, 경소로부터 경소 세포단 분리하는 단계는 클라게나아제, 트립신 또는 프로테아제의 혼합물을 상기 수득한 경소의 조직에 처리하여 실시된다. 보다 바람직하게는, 상기 2단계 효소 처리 방법, van Pelt (1996) 방법 또는 클라게나아제-트립신 처리 방법에 따라 실시된다.

① 2단계 효소 처리 방법

이 방법은 Ogawa 등 (1997)의 방법 및 그의 변형된 방법에 따라 실시된다. 클라게나아제 타입 I이 용해된 HBSS (Hank's Balanced Salt's solution)에 상기 준비된 조직 조각을 첨가하고, 일정시간 동안 반응시킨 다음 트립신으로 처리한다.

② van Pelt (1996) 방법

클라게나아제 타입 I, 트립신, 하이아두로니다아제 II 및 DNase I이 용해된 HBSS 배지에 상기 준비된 경소 조직을 분해한다.

③ 클라게나아제-트립신 처리방법

클라게나아제 타입 I 및 트립신이 용해된 HBSS에서 경소 조직을 분해하고, 피펫으로 경소 조직의 분해단 더 촉진시킨다.

이렇게 분해된 경소 조직 분해물을 적합한 세포 여과기 (평균 지름 약 70 μ m)로 여과하여 경소 세포를 회수한다.

상기 과정에 의해 수득한 정소 세포단 세포성장인자가 포함된 배지에서 배양하
정원 세포 파충레이션을 수득한다. 본 명세서에서 용어 "정원 세포 파충레이선"
정모 세포단 생성하는 세포로서의 정원 세포로 구성된 세포군뿐만 아니라, 정원줄
세포 (spermatogonial stem cells) 및 다른 정소 세포도 일부 포함되어 있는 세포
도 의미한다.

정원 세포의 배양에 이용되는 배지는 필수성분으로서 세포성장인자를 포함하며,
람직하게는 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor) (예: 염기성 섬유아
포 성장인자), 인슐린-유사 성장인자-1 (insulin-like growth factor-1), 줄기세포
자 (stem cell factor), 신경교 유래 신경영양성 인자 (glial derived
urotrophic factor) 또는 이의 조합을 포함하며, 보다 바람직하게 섬유아세포 성장
자, 인슐린-유사 성장인자-1, 줄기세포인자 또는 이의 조합을 포함하며, 가장 바람
하게는 섬유아세포 성장인자 및 인슐린-유사 성장인자-1의 혼합물을 포함한다.

바람직하게는, 본 발명에 이용되는 배지는 분화억제인자를 추가적으로
함하며, 가장 바람직하게는 류케미아 억제인자 (leukemia inhibitory factor)를 포
한다. 따라서, 본 발명의 배지에 함유되는 가장 바람직한 성장인자 및 분화억제
자의 조합은 섬유아세포 성장인자, 인슐린-유사 성장인자-1 및 류케미아 억제인자
혼합물이다.

또한, 본 발명의 배양에 이용되는 배지는 조류 혈청 (예: 닭 혈청), 포유류 혈
(예: 우태아 혈청) 또는 그의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다. 이외에도,
산화제 (예: β -머크aptop에탄올), 항생제-항마이코박테리아제 (antibiotics-

timycotics), 비펄수 아미노산 (예: 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐, 글라이신, 프롤린 및 세린), 완충제 (예: HEPES 완충액) 또는 그의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다.

상술한 정원세포의 배양은 경소 세포 파플레이션에 포함되어 있는 세르판리 세포를 기저세포로 하여 배양되는 것이지만, 만일, 정원세포를 장기 배양하는 경우에는 1로판리 세포 이외의 다른 세포를 기저세포로 하여 배양하는 것이 바람직하다.

기 배양시 이용될 수 있는 기저세포는 섬유아세포, 생식기기질세포, 경소기기질세포, 마우스 STO 세포주 (SIM mouse embryo-derived, Thioguanine- and abain-resistant fibroblast cell line)이며, 보다 바람직하게는 생식기기질세포는 경소기기질세포이며, 가장 바람직하게는 생식기기질세포이다. 만일, 본 발명의 방법이 닭에 적용되는 경우에는, 상기 섬유아세포, 생식기기질세포 및 경소기기질세포로부터 유래된 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기의 기저세포는 배지가 유된 디쉬 또는 클레이트의 저부에 위치하며, 배지로 옮겨진 정원세포는 기저세포에 부착되어 증식한다.

이렇게 배양된 정원 세포 파플레이션을 수용체 (recipient) 경소에 주입하여 카메라를 생산한다. 주입되는 정원 세포는 상술한 배양과정에서 5일-4개월, 보다 바람직하게는 5일-30일 동안 배양한 것이 바람직하다. 수용체 조류는 바람직하게는 생식후-70주령, 보다 바람직하게는 발생직후-50주령, 가장 바람직하게는 4일-40주의 수컷을 이용한다.

· 또한, 배양된 정원 세포 파플레이션뿐만 아니라, 정원 세포를 포함하는 상기의 소 세포 파플레이션도 카메라 생산에 직접 사용될 수 있다.

정원 세포 또는 정소 세포의 정소 내로의 주입은 조류 카메라 제작 시 매우 요한 단계이다. 이러한 주입은 바람직하게는 정소세판내 주입방법, 정소상체내 입방법 또는 정소망내 주입방법으로 실시할 수 있으며, 보다 바람직하게는 수용체 정소세판에 주입하는 것이고, 가장 바람직하게는 수용체의 정소세판의 가장 위쪽 분에 주입한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (d) 이후에 검정교배를 실시하 정원 세포 파플레이션이 주입된 수용체가 카메라인 지 여부를 확인한다. 예를 들어, 공여체가 검은색의 깃털을 갖는 한국 오관계 (i/i)이고, 수용체가 흰색의 깃을 갖는 화이트레그혼 (I/I)인 경우, 상습한 과정에 의해 생산된 추정 카메라 한국 오관계 (i/i)를 검정교배하여 검은색의 깃털을 갖는 닭이 자손으로 나오면, 기 추정의 카메라는 진정한 카메라로 판정될 수 있다.

본 발명의 방법은 다양한 조류, 바람직하게는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거, 꿩 또는 비둘기, 가장 바람직하게는 닭에 적용될 수 있다.

한편, 본 발명의 카메라 생산방법은 등종간 뿐만 아니라 이종간에도 실시될 있다.

상승한 과정을 통하여, 개선된 효율로 보다 용이하게 생식선 카메라 조류가 산된 수 있으며, 만일, 공여체의 정원세포에 외래 유전자를 도입하는 경우에는 안 된 형질전환 조류 생산 시스템을 제공할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 공여체의 정원세포를 정소내에 보유하고 상기 정원세포로부터 정자란 형성하는 능력을 가지며 상기 정자는 자손에게 생선 전이되는 특성을 갖는 조류 카메라란 제공한다.

이와 같이, 공여체의 정원세포가 생식선 전이되는 조류 카메라라는 본 발명자를 의해 최초로 생산된 것이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조류 카메라는 상승한 본 발의 방법에 의해 생산된 것이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 공여체 조류의 정소란 수득하 단계: (b) 상기 정소로부터 정소 세포 파플레이션 (population)을 분리하는 단계: (c) 상기 정소 세포 파플레이션 (population)을 세포성장인자가 포함된 배지에서 배하여 정원 세포 파플레이션을 수득하는 단계: 및 (c') 상기 정원 세포 파플레이션은 상기 정소 세포 파플레이션에 외래 유전자를 전이시키는 단계: (d) 상기 정원 포 파플레이션 또는 상기 정소 세포 파플레이션을 수용체 조류 정소에 주입하는 단계: 및 (e) 상기 수용체의 자손을 얻어 형질전환 조류를 생산하는 단계를 포함하는 질전환 조류의 생산방법을 제공한다.

본 발명의 방법에 있어서, 조류 정원세포 또는 정소세포에 외래 유전자단 전이키는 것은 당업계에 통상적으로 공지된 유전자 전이방법에 의해 실시될 수 있다. 근 들어, 전기동공법 (electroporation), 리포솜-매개 전이방법 (Wong, 등, 1980) 레트로바이러스-매개 전이방법 (Chen 등, 1990; Kopchick 등, 1991; Lee & uman, 1990)이 있다. 상기한 전기동공법은 본 발명자들이 개발한 방법에 따라 실행하는 것이 가장 바람직하다 (참조: 특허 제 305715 호).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 외래 유전자는 선택 마커로서 항생 내성 유전자단 포함하고, 상기 (c) 단계 이후에 항생제 내성을 나타내는 정원세포 선택하는 단계가 추가적으로 포함되며, 상기 (d) 단계는 항생제 내성을 나타내는 원세포로 실시된다. 본 발명에서 이용될 수 있는 선택 마커는, 진핵세포에 항생을 부여하는 어떠한 유전자도 가능하며, 예컨대, 네오마이신, 푸로마이신 및 제오이신 내성 유전자단 포함한다.

조류 정원세포 또는 정소세포를 수용체의 정소에 이식하는 단계는 정소세관에 원충기세포를 미세주입하는 것이 바람직하다.

이어, 수용체단 다른 개체와 교배시켜 자손을 얻게 되며, 외래 유전자들 함유한 손이 형질전환 조류가 된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따

본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는
분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

협동물

공시측으로는 한국 오관계와 화이트 레그혼 종을 사용하였으며, 각 실험동물은
소로부터 공여세포의 분리 및 분리된 공여세포의 수용체 정소 내로의 이식에 이용
었다.

여세포의 분리

공여체인 4주 또는 24주령의 한국 오관계의 정소로부터 세포를 분리하였고, 이
1994년 Brinster 등의 방법인 2단계 효소 방법 (Two step enzymatic method)란 기
로 하여 닭 정소의 특성에 따라 약간의 변형을 하였다.

닭의 정소는 포유류와는 달리 복강 내에 존재하며, 그 위치는 좌우 대칭적으로
강의 등쪽 부분에 신장에 인접하여 부착되어 있다. 또한 왼쪽 정소가 오른쪽 정
보다 큰 경향이 있으며, 등쪽에 매달린 형태로 복강 내 공기주머니 (abdominal air
c)로 둘러싸여 있다. 따라서 정소를 적출하기 위해 실험축 마취 및 외과적 수술
법이 이용되었다. 적출된 정소는 신속히 PBS 완충용액에 보관되었으며, 각 실험
로 4주령의 정소는 10-20개를 적출하였으며, 24주령의 정소는 2개를 적출하였다.
소를 적출한 후 정소주위의 결체 조직 및 막 등을 제거하고 미세 핀셋을 이용하여

소조직을 둘러싸고 있는 백막 (tunica albuginea)을 제거하였다. 정소는 해부용
급 이용하여 실제 현미경 하에서 잘게 부순 후 HBSS (Hank's Balanced Salt's
lution, Invitrogen)에 칸라게나아제 타입 I (1mg/ml, Sigma)을 녹인 후 37℃ 흔
배양기 (shaking incubator)에서 15분간 처리하였다. HBSS로 세척 후 다시 0.25%
립신-1 mM EDTA로 15분간 처리하였다. 분해된 정소조직량은 70 µm 세포여과기
ell strainer, Falcon 2350)로 거른 후 트립판 간투를 이용하여 정원세포의 생존을
↓ 세포수를 측정하였다.

원세포의 체외배양

단일세포로 분리 후 이식 전까지 체외에서 단기간 배양하였다. 기간은 0일, 5
, 10일 및 15일이며, 세포는 어린 주령 (4주령)과 성숙숙 이후 주령 (24주령)의 정
로부터 분리된 정소세포를 이용하였으며, 1 X 10⁶ 세포를 100 mm 세포배양접시에서
↑각 5% CO₂ 배양기에서 37℃로 배양하였다.

세포 배양액은 DMEM (Dulbecco's minimal essential medium, Gibco Invitrogen)
지에 10 % (v/v) ES cell 전용 우태아 혈청 (FBS, Hyclone, Logan

), 1x 항생제-항마이코박테리아제 (Invitrogen), 2% 닭 혈청, 10 mM 비필수 아미노산, 10 mM HEPES 완충액 및 0.55 mM β -머캅토포에탄올을 첨가하였으며, 성장인자로 10 ng/mL 인간 류케미아 억제 인자 (Sigma), 10 ng/mL 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자 (Sigma) 및 100 ng/mL 인간 인슐린-유사 성장 인자-I (Sigma)의 혼합물을 첨하여 사용하였다. 각 처리구는 5일, 10일 및 15일간 배양 후, 5분간의 0.25% 트립신-1 mM EDTA 효소처리에 의해 배양접시로부터 분리 및 원심 분리하여 세포를 농축 후 이식에 사용하였다.

원세포의 이식

분리 혹은 체외 배양된 정원세포는 원심분리하여 2×10^7 cells/50-100 μ L로 농하여 수용체 정소 내로 이식하였다. 이식은 어린 주령인 (7주령) 과 성숙인 (24령) 수용체 닭으로 구분하여 진행하였고, 전신 마취를 위하여 케타민 주사액 (유한행)을 10 mg/kg (20 μ L)로 익경맥 내로 혈관 주사하였다. 이후 마취된 닭의 오른쪽 아래 복부를 절개하고, 척추 아래쪽에 위치한 정소를 확인하였다. 정소의 확인 준비된 세포 부유액을 주사기와 바늘 (Hamilton, 100 μ L, 33G)을 이용하여 정소로 주입하였다. 주입 시에 바늘의 끝은 정소의 외막쪽을 이용하는데 이는 정소세의 가장 위쪽 부분 (upstream)에 세포를 이식하고자 하기 위해서 이다. 주입이 난 후 절개된 복부의 내막과 외막을 수술용 봉합사와 바늘을 이용하여 봉합하고, 술 부위를 소독한 후, 항생제를 투여하였다.

원세포 주입의 확인

닭의 해부학적 구조상 정소는 복강내, 척추 아래에 위치하고 있으므로 마우스에 의 주입방식인 수술을 통해 정소를 노출 시켜서, 현미경 하에서 수술을 진행하기가 어렵다. 따라서 이때에는 주입 바늘의 굵기와 주입시의 각도 등이 중요하게 작용한다. 따라서 분리된 정소에 같은 게이지의 주사바늘을 이용하여 현미경 하에서 트판 검투를 주입함으로써 정소세관 내로 세포의 주입이 가능한지를 확인하였다.

식선 카이메라의 확인을 위한 검정교배

수용체인 화이트 레그혼의 정소내로 이식된 한국 오골계의 정원세포로부터 정자형성되는 지를 검증하기 위해서 검정교배를 실시하였다. 화이트레그혼 (I/I)은 은색에 대하여 우성이므로 검은색인 오골계 (i/i)와 교배할 경우에 흰색의 병아리 (I/i)를 생산하게 되지만, 수용체 정소 내로 이식된 오골계의 정원세포로부터 유래된 정자와 오골계 알컷이 난자가 결합할 경우 정상 형태인 검은색 오골계 병아리 (i/i) 생산하게 되고, 이는 생식선 카이메라로 검증이 가능하다.

합 결과

원세포 주입의 확인

닭의 해부학적 구조상 정소는 복강내, 척추 아래에 위치하고 있으므로 마우스에 의 주입방식인 수술을 통해 정소를 노출 시켜서, 현미경 하에서 수술을 진행하기가 어렵다. 따라서 주입용 바늘의 굵기와 주입시의 각도 등이 중요하게 작용한다.

•

라서 분리된 정소에 실제 수술시 사용된 것과 같은 게이지의 주사바늘을 이용하여
미경 하에서 트립판 간두간 주입함으로써 정소세관 내로 세포의 주입이 가능한지를
연구하였다. 도 2에서 볼 수 있듯이, 트립판 간두 용액이 세정관을 따라 주입되는
을 확인할 수 있으며, 정소 전체에 걸쳐 주입이 이루어지는 모습을 볼 수 있었다.
라서 본 연구에서 확립한 수술 방법과 동일한 주사바늘을 이용하였을 경우에 성공
으로 수용체 정소내로 정원세포의 주입이 가능함을 보여주고 있다.

식선 카이메라 생산 효율의 비교

생식선 카이메라의 생산 조건을 확립하기 위하여 검정교배를 실시하였다. 이
수술 후 실험축이 회복된 2주 후부터의 오곧게 암컷과 검정교배를 실시하였으며,
실험구 별로 4수의 실험축을 조성하였다. 본 실시예에서 이용된 정원세포는
10일동안 체외 배양한 것이다.

표 1 및 2에서 확인할 수 있듯이, 정원세포를 이식하여 생식선 카이메라의 생산
가능한 것을 알 수 있었지만, 마우스에서의 결과와 비교해 볼 때 전반적으로 그
율이 비교적 낮았다. 이와 같은 생식선 카이메라의 낮은 생산 효율은 이식된 정
세포와 이미 존재하는 수용체-유래 정원세포와의 경쟁 때문이라 볼 수 있다. 이
부설판 (Busulphon) 처리와 같은 불임화 기술을 적용하면 극복될 수 있을 것으로
단된다.

표 1]

저체와 수용체의 주련에 따른 생식선 카메라 효율 비교

생식선 카메라 생산 시스템

이식된 닭의 수

정교배된 닭의 수

생식선 카메라로 입증된 닭의 수 (%)

여체 닭의 주련

수용체 닭의 주련

정계 (24주령)

정계 (24주령)

16

16

3 (18.8)

정계 (4주령)

정계 (24주령)

16

16

0 (0.0)

정계 (24주령)

영계 (7주령)

16

16

1 (6.3)

정계 (4주령)

영계 (7주령)

16

16

1 (6.3)

표 2]

저체와 수용체의 주령에 따른 생식선 카메라의 개체별 생식선 전이 효율 비교		생식선 카메라의 ID		생식선 카메라로부터 생산된 자손의 수 (X) ^a	백분율 갖는 자손의 수 (X) ^b
여체 닭의 주령	수용체 닭의 주령				
정계 (24주령)	정계 (24주령)	YW13	2 (3.6)	54 (96.4)	
		YW14	1 (3.2)	31 (96.8)	
		YW38	2 (1.6)	124 (98.4)	
정계 (4주령)	정계 (24주령)	-	-	-	
정계 (24주령)	영계 (7주령)	YW75	1 (0.9)	11 (99.1)	
정계 (4주령)	영계 (7주령)	YW72	1 (4.8)	20 (95.2)	

정교배된 생식선 카메라 닭에서 공여세포-유래 자손 (흑익)의 수의 백분율
하이트레그혼 및 오글계 사이의 하이브리드 닭의 수의 백분율

한편, 도 3에서, 흰색의 병아리는 정상의 화이트 레그혼과 오글계로부터 생산된 자손이며, 검은색의 병아리는 주입된 오글계의 정원세포로부터 유래하여 발생한 자손으로서 주입한 오글계의 정원세포가 수용체 화이트레그혼의 정소에서 정상적으로 열 및 분화하였음을 보여주는 것이다.

원세포의 체외 배양

체외에서 단기 배양한 오글계 정소 세포의 경우, 15일간 체외 배양으로 세포를 지할 수 있었다. 도 4 및 5에서 볼 수 있듯이, 4주령 정소세포를 체외 배양한 결

안정적으로 유지할 수 있었으며 15일 이후에는 군집 (colony)를 형성하며 세포수 증가하는 것을 알 수 있었다. 성제인 24주령 경소세포를 체외 배양한 결과도 4령과 유사하게 안정적으로 유지할 수 있었으며, 15일 이후에는 군집 (colony)를 형성하며 세포수가 증가하는 것을 알 수 있었다.

한편, 단기간 체외 배양 후 생식선 카이메라의 생산 효율을 비교하였다. 표 3에 기재된 바와 같이, 체외에서 5일간 배양 후 그리고 10일간 배양 후에 세포를 이식하였을 경우에 생식선 카이메라의 생산을 확인할 수 있었으며, 후대 생산 효율, 생식선 전이 효율은 체외에서 5일간 배양 후 이식하였을 때가 가장 높았다.

표 3]

외배양 기간에 따른 생식선 카이메라 생산 효율 비교				
생식선 카이메라 생산 시스템	이식된 배 개체수	검정교배된 배 개체수	생식선 카이메라로 입증된 배 개체수	
외배양 기간	이식된 세포수			
0일	2.0 x 10 ⁷	16	16	2 (12.5)
5일	2.0 x 10 ⁷	16	16	2 (12.5)
10일	2.0 x 10 ⁷	16	16	1 (6.3)

표 4]

리피와 기간에 따른 생식선 카이메라의 개체별 생식선 전이 효율 비교		생식선 카이메라의 ID		생식선 카이메라로부터 생산된 자손의 수 (%) ^a		백분율 같은 자손의 수 (%) ^b	
생식선 카이메라 생산 시스템	이식된 세포수	생식선 카이메라의 ID		생식선 카이메라로부터 생산된 자손의 수 (%) ^a	백분율 같은 자손의 수 (%) ^b		
0일	2.0 × 10 ⁷	YW14		1 (3.2)	31 (96.8)		
		YW38		2 (1.6)	124 (98.4)		
5일	2.0 × 10 ⁷	YW13		2 (3.6)	54 (96.4)		
		YW72		1 (4.8)	20 (95.2)		
10일	2.0 × 10 ⁷						
		YW75		1 (0.9)	111 (99.1)		
[정교배된 생식선 카이메라 내에서 공여세포-유래 자손 (흑익)의 수의 백분율 화이트레그혼 및 오금계 사이의 하이브리드 닭의 수의 백분율]							

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과]

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 정원세포를 이용한 조류 카이메라의 생산방법, 생식선 전이 조류 카이메라 형질전환 조류의 생산방법을 제공한다. 발명의 방법에 따르는 경우에는 개선된 효율로 보다 용이하게 생식선 조류 카이메라를 얻을 수 있다.

고 문헌

Avarbock, M.R., et al., 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen
ermatogonial stem cells. Nat. Med. 2, 693-696.

Brinster, R.L., et al., 1994. Germline transmission of Donor haplotype
llwing spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. 91,
303-11307.

Brinster, R.L., et al., 1998. Spermatogonial transplantation,
yopreservation and culture. Cell Dev. Biol. 9, 401-409.

Brinster, R.L., et al., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell
ansplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 11298-11302.

Cibelli, J. B., et al., 1998. Cloned transgenic calves produced from
nquiescent fetal fibroblasts. Science 280, 1256.

Clouthier, D.E., et al., 1996. Rat spermatogenesis in mouse testes following
ermatogonial stem cell transplantation. Nature 381, 418-421.

Dobrinski, I., et al., 1999a. Transplantation of germ cells from rabbits and
gs into mouse testes. Biol. Reprod., 61, 1331-1338.

Dobrinski, I., et al., 1999b. Computer assisted image analysis to assess
lonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells
om transgenic donor mice. Mol. Reprod. Dev. 53, 142-148.

. Dobrinski, I., et al., 2000. Germ cell transplantation from large domestic
imals into mouse testis. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 270-279.

Dym, M., 1994. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc. Natl. Acad.*
i. 91, 11287-11289.

. Franc a, L., et al., 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during
ermatogenesis. *Biol. Reprod.* 59, 1371-1377.

. Jiang, F.-U., et al., 1998. Different fate of primordial germ cells and
nocytes following transplantation. *APWIS* 106, 53-63.

. Jiang, F.-X., et al., 1995. Male germ cell transplantation in rats:
parent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous
ithelia. *Int. J. Androl.* 18, 326-330.

. Nagano, M., et al., 1998. Spermatogonial transplantation and reconstitution
donor cell spermatogenesis in recipient males. *APWIS* 106, 47-57.

. Nagano, M., et al., 1998. Culture of mouse spermatogonial stem cells.
ssue *Cell* 30, 389-397.

. Nagano, M., et al., 1999. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial
em cell colonization in recipient testes. *Biol. Reprod.* 60, 1429-1436.

. Ogawa, T., et al., 1997. Transplantation of testis germinal cells into
use seminiferous tubules. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 111-121.

1. Ogawa, T., et al., 1998. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue Cell* 30, 583-588.
2. Ogawa, T., et al., 1999a. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell*, 31, 461-472.
3. Ogawa, T., et al., 1999b. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol. Reprod.* 60, 5-521.
4. Pereira, G., et al., 1998. Development of testis cell transplants. *Biol. Reprod.* 59, 1360-1370.
5. Pereira, G.G., et al., 1999. Development of germ cell transplants: morphometric and ultrastructural studies. *Tissue Cell* 31, 241-254.
6. Russell, L.D., et al., 1996. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *J. Androl.* 17, 615-627.
7. Schlatt, S., et al., 1999. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey, and human testes. *Hum. Reprod.* 14, 144-150.
8. Schnieke, A.E., et al., 1998. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblast. *Science* 278, 2130-2133

. Shinohara, T., et al., 1999. B1- and A6-integrin are surface markers on
,
use spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 5504-5509.

. Van Pelt AM, et al., 1996 Isolation of the synchronized A spermatogonia
om adult vitamin A-deficient rat testes. Biol Reprod 55:439-444

. Vincent, S., et al., 1998. Development (Cambridge, U.K.) 125, 4585-4593.

. Wilmut, I., et al., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult
mmalian cells. Nature 385, 810-813

. Yoshinaga K, et al., 1991. Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis:
entification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and
nction. Development 113: 689-699

. Zhang Z, et al., 2003. Successful intra- and intrespecific male germ cell
ansplantation in the rat. Biol. Reprod. 68: 961-967

. Zirkin BR, et al., 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? J
drol 15:273-276

【특허청구범위】

【요구항 1】

다음의 단계들 포함하는 정원세포를 이용한 조류 카메라의 생산방법:

(a) 공여체 조류의 정소를 수득하는 단계;

(b) 상기 정소로부터 정소 세포 파플레이션 (population)을 분리하는 단계;

(c) 상기 정소 세포 파플레이션 (population)을 세포성장인자가 포함된 배지에

배양하여 정원 세포 파플레이션을 수득하는 단계; 및

(d) 상기 배양한 정원 세포 파플레이션 또는 상기 정소 세포 파플레이션을 수용
조류 정소에 주입하여 카메라를 생산하는 단계.

【요구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 콜라게나아제, 트립신 또는 이의 혼합물을
기 수득한 정소의 조직에 처리하여 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【요구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 세포성장인자는 섬유아세포 성장인자, 인슐린- 유사 성
인자-1, 줄기세포인자 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으
하는 방법.

부구항 4)

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 분화억제인자란 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 5)

제 4 항에 있어서, 상기 분화억제인자는 류케미아 억제인자인 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 6)

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 섬유아세포 성장인자, 인슐린-유사 성장인자-1 류케미아 억제인자의 혼합물을 포함하는 보충물을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

부구항 7)

제 1 항에 있어서, 상기 배지는 혈청 및 항산화제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

§구항 8]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 정원 세포 파플레이션 또는 경소 세포 파플레이션을 수용체의 경소세포판으로 주입하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

§구항 9]

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 정원 세포 파플레이션 또는 경소 세포 파플레이션을 수용체의 경소세포판의 가장 위쪽 부분에 주입하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

§구항 10]

제 1 항에 있어서, 상기 조류는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 또는 비기인 것을 특징으로 하는 방법.

§구항 11]

제 1 항에 있어서, 상기 공여체 및 수용체는 이종인 것을 특징으로 하는 방법.

§구항 12]

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d) 이후에 검정교배를 실시하여 정원 세포 파플레이션이 주입된 수용체가 카이메라인 지 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함하

것을 특징으로 하는 방법.

¶구항 13]

공여체의 정원세포를 정소내에 보유하고 상기 정원세포로부터 정자를 형성하는
력을 가지며 상기 정자는 자손에게 생식선 전이되는 특성을 갖는 조류 카이메라.

¶구항 14]

제 13 항에 있어서, 상기 조류 카이메라는 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한
의 방법에 의해 생산된 것을 특징으로 하는 조류 카이메라.

¶구항 15]

다음의 단계들 포함하는 형질전환 조류의 생산방법:

(a) 공여체 조류의 정소를 수득하는 단계;

(b) 상기 정소로부터 정소 세포 파플레이션 (population)을 분리하는 단계;

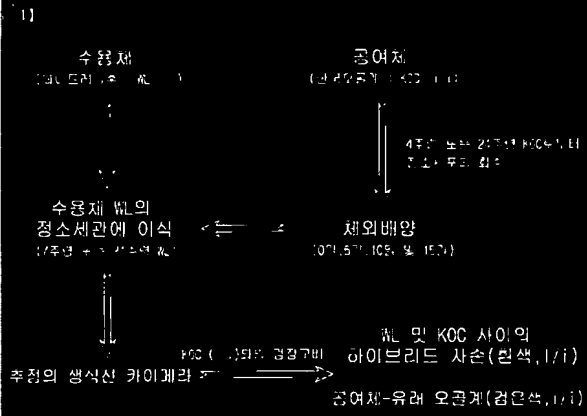
(c) 상기 정소 세포 파플레이션 (population)을 세포성장인자가 포함된 배지에
배양하여 정원 세포 파플레이션을 수득하는 단계; 및

(c') 상기 정원 세포 파플레이션 또는 상기 정소 세포 파플레이션에 외래 유전
물질 전이시키는 단계;

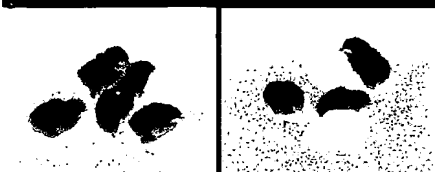
•

- (d) 상기 경원 세포 파플레이션 또는 상기 정소 세포 파플레이션을 수용체 조
정소에 주입하는 단계: 및
- (e) 상기 수용체의 자손을 얻어 형질전환 조류를 생산하는 단계.

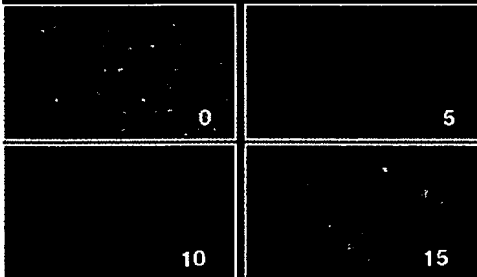
【도면】

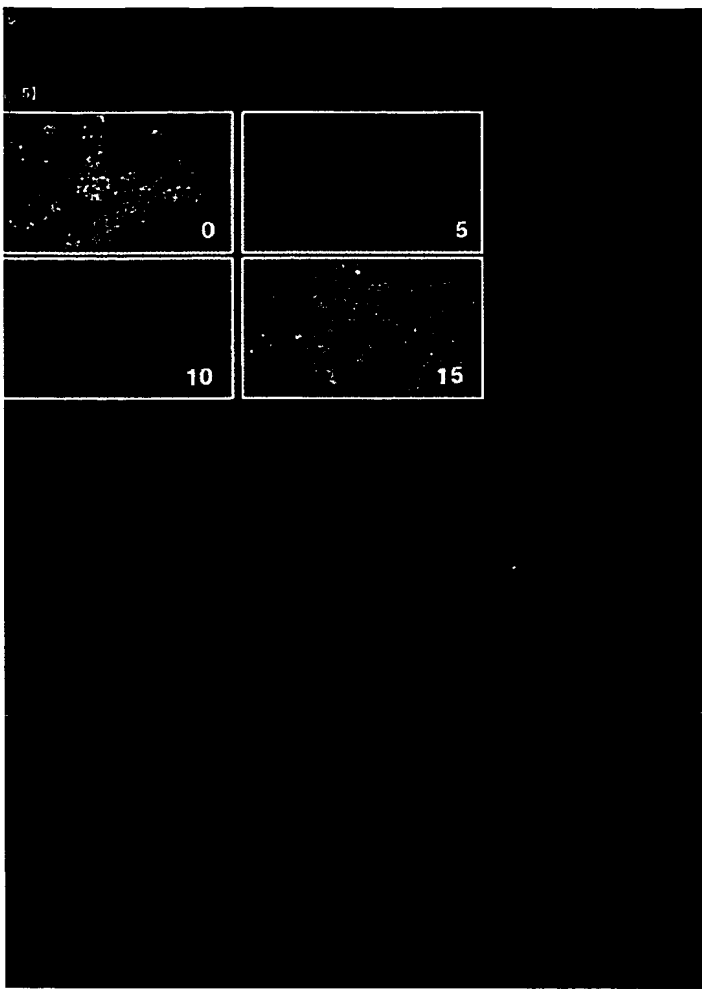


01



01





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.